

## キンギョのウロコを用いた培養系における磁場の骨芽及び破骨細胞に対する影響

鈴木信雄<sup>1</sup>, 柿川真紀子<sup>2</sup>, 山田外史<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設;

<sup>2</sup>〒920-8667 金沢市小立野 金沢大学自然計測応用研究センター

Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>, Makiko KAKIKAWA<sup>2</sup>, Sotoshi YAMADA<sup>2</sup>: Effects of magnetic fields on osteoblasts and osteoclasts in an *in vitro* culture system using goldfish scales

ヒトの脊椎骨は破骨細胞と骨芽細胞から構成され、これら2種類の細胞はコミュニケーションをとり、お互いに増殖及び分化を制御している。しかしながら、両方の細胞を同時に培養することは、非常に難しく、これまでの骨形成に関する知見は、ほとんどが単独で培養した結果に基づいている。一方、磁場が骨形成を促すということは、よく知られている。さらにそれを利用した治療機器も発売されているが、そのメカニズムに関する基礎的なデータは少ない。そこで本研究では、魚類のウロコの特徴を生かした骨のモデルとなる培養系を用い、そのメカニズムの解析を行った。

材料としてキンギョ (*Carassius auratus*) を用い、以下2種類の実験を行った。

実験1：超低周波磁場による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響

キンギョ (*Carassius auratus*) (メス30匹) を麻酔 (MS222, Aldrich Chemical Company Inc.) し、ウロコを取り、2ml 用のチューブ (BM 機器) に入れた。次にそのチューブに HEPES (20mM) (pH7.0) 及び抗生物質 (1%) を含む培地 (MEM, ICN Biomedicals Inc.) を 500  $\mu$ l 加えた。そのチューブを 3、5、10 及び 30mT の磁場に 15°C、24 時間曝露し、破骨及び骨芽細胞の活性に及ぼす影響を調べた。磁場発生装置の詳細は、Miyakawa et al. (2001) に示してある。本研究では、破骨細胞の活性の指標として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) を用い、骨芽細胞の活性の指標としてアルカリフォスファターゼ (ALP) を使用し、磁場の骨組織に対する作用を調べた。詳細な方法は、Suzuki and Hattori (2002) に示してある。また培地中に放出された酵素活性も同様に測定した。

実験2：超低周波磁場の遺伝子発現に及ぼす影響

キンギョ (メス5匹) のウロコを取り、実験1と同様に 30mT の磁場に曝露 (15°C、24 時間) した。そのウロコからアイソゲン (ニッポンジーン) により mRNA を抽出し、タカラのキットを用いて cDNA を合成した。破骨細胞のマーカーである calcitonin receptor 及び骨芽細胞のマーカーである insulin-like growth factor-I と estrogen receptor の発現を RT-PCR により解析した。詳細な方法は、Suzuki et al. (1997) に示してある。

ウロコの培養系を用いて、超低周波磁場 (3mT) による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響を評価した結果、破骨細胞の活性が有意に低下した。また、細胞の活性と同様に培地中の TRAP 活性もコントロールに比べて有意に低下していた。一方、ウロコの骨芽細胞の活性は変化しなかったが、培養液中の ALP 活性が、コントロールと比較して上昇していた。したがって、3mT の磁場刺激でも骨形成が進行中であると推測さ

れる。さらに 5mT でも 3mT と同様の結果が得られた。

10 及び 30mT では、骨芽細胞の活性が上昇し、それに伴い破骨細胞の活性も上昇していた。これら 2 種類の細胞は、密接に連絡しており、骨芽細胞で発現しているリガンドである Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) と破骨細胞にあるレセプターである Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) とにより結合することにより、破骨細胞が活性化し、多核の活性型の破骨細胞に分化する (Teitelbaum, 2000)。したがって、10 及び 30mT で 24 時間曝露することにより、骨芽細胞が活性化し、RANK-RANKL を通して破骨細胞も活性化されたと考えられる。

超低周波磁場の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた結果、膜レセプターである calcitonin receptor mRNA の発現は上昇したが、核レセプターである estrogen receptor mRNA の発現は変化しなかった。磁場刺激は、細胞膜に影響を及ぼし、細胞活性に影響を与えていると考えられているので、これまでの知見 (Luben, 1991) と一致している。calcitonin receptor は破骨細胞に特異的に発現している遺伝子なので、実験 1 で得られた結果と一致している。さらに insulin-like growth factor-I は骨芽細胞で特異的に発現している遺伝子であり、ALP 活性の上昇と同様にその mRNA レベルも上昇していた。したがって、calcitonin receptor に加えて insulin-like growth factor-I の発現に関しても実験 1 の結果を支持していた。

以上のことから、磁場刺激に対する反応性は破骨細胞の方が高く、まず破骨細胞の活性が低下し、次に磁場強度が上がると、骨芽細胞が活性化され、破骨細胞も活性化させる可能性が示された (Table 1 参照)。副甲状腺ホルモンは、骨芽および破骨細胞の両方の細胞活性を上昇させて、骨形成を促していることが最近わかってきた (Neer et al., 2001)。したがって、磁場による骨形成も副甲状腺ホルモンのようなメカニズムで進行している可能性が高い。

Table 1. Effects of magnetic fields on osteoclastic and osteoblastic activities in an *in vitro* culture system using goldfish scale that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix.

	Osteoclastic activity	Osteoblastic activity
3mT	decrease	no change
5mT	decrease	no change
10mT	increase	increase
30mT	increase	increase

#### 引用文献

- Luben, R.A.: Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. *Health. Phys.*, 61: 15-28 (1991)
- Miyakawa, T. et al.: Exposure of *Caenorhabditis elegans* to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses. *Bioelectromagnetics*, 22: 333-339 (2001)
- Neer, R.M. et al.: Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in post-menopausal women with osteoporosis. *N. Eng. J. Med.*, 344: 1434-1441 (2001)
- Suzuki, N. et al.: Nucleotide sequences of reptile calcitonins: their high homology to chicken calcitonin. *Zool. Sci.*,

14: 833-836 (1997)

Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish.

J. Pineal Res., 33: 253-258 (2002)

Teitelbaum, S.L.: Bone resorption by osteoclasts. Science, 289: 1504-1508 (2000)

#### 謝辞

本研究の一部は、平成 16 年度（財）磁気健康科学研究振興財団研究助成（代表：鈴木信雄）、平成 17 年度（財）中部電力基礎技術研究所研究助成（代表：鈴木信雄）及び科学研究費補助金（基盤研究（C）No. 18500375、代表：鈴木信雄）の援助により行われた。